# 棘腹蛙生长激素/类胰岛素样生长因子轴关键基因的克隆与序列特征分析

罗 洁 姜玉松 杨 帆 樊汶樵* 李晓英

（重庆文理学院林学与生命科学学院，重庆珍稀濒危水产资源保护与开发研究中心，重庆 402168）

摘 要：机体的生长激素（GH）/类胰岛素样生长因子（IGFs）轴由 GH 系统和 IGFs 系统构成，可促进细胞增殖、调节生长发育、调控生理代谢，在机体生长发育调控方面有着重要作用。为明确棘腹蛙 GH/IGFs 轴的功能结构和进化特征，为棘腹蛙生长发育调控方面的研究提供理论依据，本试验对棘腹蛙 *GH*、类胰岛素生长因子-Ⅰ（*IGF*-Ⅰ）和类胰岛素生长因子-Ⅱ(*IGF*-Ⅱ)进行克隆并对其序列特征进行分析。结果发现：1）与两栖类模式动物的多重序列比对发现棘腹蛙 *GH*、*IGF*-Ⅰ和 *IGF*-Ⅱ的功能结构域严格保守，具有一定的遗传多态性；*IGF*-Ⅱ的 N 端呈简缩进化趋势。2）遗传进化聚类分析发现棘腹蛙 *IGFs* 与两栖动物聚为一支，并与硬骨鱼相对近缘，说明 *IGF*-Ⅰ和 *IGF*-Ⅱ进化地位相对原始；棘腹蛙 *GH* 则与蛙类、鱼类等水生动物相对近缘，暗示该基因具有趋同进化趋势。3）为进一步明确上述基因的特异性功能位点，利用 SWISS 软件解析其蛋白质结构，最终确定 IGF-Ⅰ的 THR52、LEU53、PHE72、PHE73、SER74 为潜在的功能分化位点，IGF-Ⅱ的 TYR81、LYS82、LYS83 为潜在的功能分化位点，GH 的 PHE208 为潜在的功能分化位点。由此可知，棘腹蛙 GH/IGFs 轴的主要基因相对保守，但与已知模式物种相比，存在潜在的功能分化位点，可作为后期棘腹蛙 GH/IGF 轴功能研究和遗传进化特征分析的分子靶标。

关键词：棘腹蛙；类胰岛素生长因子；生长激素；序列分析；结构特征

中图分类号： 文献标识码：A 文章编号：

生长激素（GH）是腺垂体细胞分泌的肽类激素，是影响动物生长和发育的主要内源因素。类胰岛素生长因子（IGFs）分为类胰岛素生长因子-I（IGF-I）和类胰岛素生长因子-II(IGF-II)2 种类型，是存在于血浆内的一类既有促生长作用又有胰岛素样作用的多肽。目前已阐明机体的生长是由 GH/IGFs 轴所控制，GH 从垂体分泌后，通过 GH 受体的介导进而刺

---

收稿日期：2016-12-07

基金项目：重庆市基础科学与前沿技术研究(重点)专项（cstc2015jcyjBX0013）；重庆市前沿与应用基础研究(一般)项目（cstc2014jcyjA80042）；永川区自然科学基金项目（Ycstc,2015nc1001）；重庆文理学院人才引进项目（R2013LS14，R2014LX07）

作者简介：罗 洁（1983-），女，河南周口人，博士，主要从事微生物与免疫研究。E-mail: luojiecq@sina.cn

*通信作者：樊汶樵，副教授，E-mail: wonderbreeze@126.com

激肝脏和其他组织合成并分泌 IGFs，后者通过 IGFs 受体的介导发挥生物学功能[1]。

棘腹蛙（*Paa boulengeri*）又名石坑、石蛙等，隶属于无尾目，蛙科，棘蛙属，是我国西部中高海拔区域特有的珍稀两栖动物[2-3]。由于环境污染、生态破坏等原因，野生棘腹蛙的规模日趋萎缩，现已被《中国濒危物种红皮书》[4]、《中国物种红色目录》[5]等收录。棘腹蛙目前市场需求旺盛，人工饲养的子二代出栏价达到 45～70 元/kg，其人工养殖已经成为山区农民脱贫致富的重要途径。为更好的保护野生资源，同时满足经济需求，棘腹蛙的人工养殖热度逐年上升。

本课题组前期对棘腹蛙的人工饲养条件进行探索时发现，温度过高或过低都会影响其生长发育，而温度对 GH/IGFs 轴的影响尤为明显。对棘腹蛙的遗传特性研究发现棘腹蛙种群属于一个单系分支[6-7]，在进化过程中相对独立[8-9]，并无其他模式物种的相关数据可以参考。本研究拟从转录组测序获得的信息入手，克隆 GH/IGFs 轴的关键基因（*IGF*-Ⅰ、*IGF*-Ⅱ和 *GH*）并对其进行生物信息学分析，深入了解其基因特性，发掘物种特异性的潜在功能作用位点，为探索以棘腹蛙为代表的两栖动物的生理反应和生长发育调节机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与耗材

2 岁龄健康棘腹蛙，饲养于重庆珍稀濒危水产资源保护与开发研究中心两栖动物流水养殖系统。Trizol、焦碳酸二乙酯（DEPC）购自上海生工生物工程有限公司，cDNA 合成试剂盒、Taq 酶、PCR 纯化试剂盒购自 Promega 公司，凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司，DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.2 引物设计与合成

基因序列主要基于前期本实验室建立的棘腹蛙蝌蚪的 Illumina solexa 第二高通量转录组数据库，利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分别获取了棘腹蛙 *GH*、*IGF*-Ⅰ、*IGF*-Ⅱ的全长基因序列，并经过比对验证其序列与转录组数据结果一致。最后，利用 Primer 5.0 软件设计基因的特异性引物，由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

| 基因名 Gene names | 引物序列 Primer sequences | 扩增长度 Amplification length/bp |
|---|---|---|
| **类胰岛素生长因子-Ⅰ** ***IGF*-Ⅰ** | F：5′-ATCCTTCTTCTGTTTGCTAAATCTG-3′<br>R：5′-CTCTAGGGGACACAGGCTATTA-3′ | 904 |
| **类胰岛素生长因子-Ⅰ** ***IGF*-Ⅰ** | F：5′-GCAACATCCAGCAATACCACAGCGA-3′<br>R：5′-CTTTGGTGTCTCAGTTTGCTCGTTT-3′ | 944 |
| **生长激素** ***GH*** | F：5′-TGGAACCCGAACATACATCAGGAAC-3′<br>R：5′-AGACACAAAAAGCACAAAGCAAAAT-3′ | 862 |

1.3 cDNA 制备

取双毁髓法处死的棘腹蛙肝脏，立即放入液氮中。随后总 RNA 按照试剂盒说明书进行提取，并利用 Promega 公司的 cDNA 合成试剂盒说明书完成单链 cDNA（ss cDNA）的制备。

1.4 序列克隆与测定

利用高保真 DNA Taq 酶进行 PCR 扩增，RT-qPCR 反应体系为：cDNA 模板 1 μL、10×Ex Taq PCR buffer 2.5 μL、Ex Taq 0.65 U、dNTP（100 μmol/L）1 μL、$MgCl_2$ 1 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL，加 dd$H_2O$ 至总体积 25 μL。采用 PCR 反应程序：1）94 ℃预变性 4 min；2）94 ℃变性 90 s；3）58 ℃退火 90 s；4）72 ℃延伸 90 s；5）将步骤 2～4 重复循环 30 次；6)72 ℃终延伸 10 min；7）12 ℃保存。最后，PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测后切

取与基因长度一致的片段，经 TaKaRa 凝胶回收试剂盒纯化后连接 pMD 19-T 载体，并转化至大肠杆菌（*E. coli*）JM109 感受态细胞中，利用蓝白斑筛选阳性质粒，经双酶切验证后送苏州金唯智生物科技有限公司测序。

### 1.5 生物信息学分析

#### 1.5.1 遗传多态性分析方法

在 NCBI 数据库中检索 *GH*、*IGF-*Ⅰ、*IGF-*Ⅱ的同源序列，利用 ClustalX 1.83 软件进行多重序列比对和 Boxshade Server 序列对齐，最后结果由 Photoshop CS6 进行处理。

#### 1.5.2 遗传进化分析

在 GenBank 数据库中检索近缘物种序列，利用 ClustalW 对齐后，利用 MEGA 5.0 软件对 *GH*、*IGF-*Ⅰ、*IGF-*Ⅱ同源基因进行邻近（neighbor-joining）法构建系统进化树，取 1 000 次重复检验以估算各分支的置信值。

#### 1.5.2 蛋白质结构分析

首先利用 Phyre2 软件（http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/）检索蛋白质模型，然后使用 Swiss-model server 软件（https://swissmodel.expasy.org/）预测目的蛋白质的三维结构，最后采用 Swiss-Pdb-viewer 软件进行图像处理和蛋白质结构还原。

## 2 结果与分析

### 2.1 *IGF-*Ⅰ的序列特征分析

以 2 岁龄棘腹蛙肝脏组织 cDNA 为模板进行 *IGF-*Ⅰ的基因扩增（图 1-A）及测序（图 1-B），并将棘腹蛙 *IGF-*Ⅰ与已发布的 2 种蟾蜍的近缘基因进行比较，发现前者保守的功能结构域存在较多的氨基酸位点突变（图 1-C）。




A　　　　　　　　　　　　B

```
XP_002936875.1     METNNNLSTQLFKCYFCDILKLMHKMSCIHLLYLVLCFLTLTHSAAAGPEAECGAELVD
NP_001156865.1     MEKNNSLSTQLFKCYFCDFLKLMHKMSYIHLLYLALCFLTLTHSAAAGPEEPCGAELVD
IGF__I-like-Pb     MEKNNCPSTQLFKCYFCDILKVRMHTMTYMHLFYLGLCLLTLTHSAAAGQETLCGAELVD
                   **.**  ************:**::**.*: :**:** **:*********** *  *******

XP_002936875.1     TLQFVCGDRGFYLTYPTGYGSNNRRSHHRGIVDECCFQSCDFRRLEMYCAPAKPAKSARS
NP_001156865.1     TLQFVCGDRGFYLPTGYGSSNRRRRSHHRGIVDECCFQSCDFRRLEMYCAPAKPAKSARS
IGF__I-like-Pb     ALQFVCGDRGFFFSKPVGYGYSSRRSHHKGIVDECCFQSCDLRRLEMYCAPAKPAKSARS
                   :***********:   *.***  ..*****:*************:********************

XP_002936875.1     VRAQRHTDMPKAQKEVHPKNTSRGNTGSRGFRM
NP_001156865.1     VRAQRHTDMPKAQKEVHLKNASRGNTGSRGFRM
IGF__I-like-Pb     VRAQRHTDMPKAQKEVHHKNASRGNTGSRSFRM
                   ***************** **:*********.***
```

C

A:棘腹蛙 *IGF*-Ⅰ的基因扩增;B:棘腹蛙 *IGF*-Ⅰ的序列分析;C:已知两栖动物*的* *IGF*-Ⅰ遗传多态性分析。NP_001156865.1 注释为非洲爪蟾 *IGF*-Ⅰ；XP_002936875.1 注释为热带爪蟾 *IGF*-I。黄色表示棘腹蛙 *IGF-Ⅰ*潜在功能分化位点。

A: the gene amplification of *IGF*-Ⅰ from *Paa boulengeri*; B: the sequence analysis of *IGF*-Ⅰ from *Paa boulengeri*; C: the genetic polymorphism analysis of *IGF*-Ⅰ from known amphibians. NP_001156865.1 represents for *IGF*-Ⅰ from *Xenopus laevis*; XP_002936875.1 represents for *IGF*-Ⅰ from *Xenopus tropicalis*. The potential differentiation amino acid sites of *IGF*-Ⅰ from *Paa boulengeri* are shadowed in yellow.

图 1　棘腹蛙 *IGF*-Ⅰ序列特征分析

Fig.1　The sequence characteristic analysis of *IGF*-Ⅰ form *Paa boulengeri*

取不同代表物种 *IGF*-Ⅰ进行聚类分析并构建系统进化树（图 2），发现 *IGF*-Ⅰ主要分为两大支，一支为高等哺乳动物，一支为爬行动物、鸟类和两栖动物；其中，棘腹蛙 *IGF*-Ⅰ与无尾目两栖动物、部分水栖性爬行动物聚为一支，与其他陆生脊椎动物近缘，说明棘腹蛙 *IGF*-Ⅰ与两栖类模式动物爪蟾 *IGF*-Ⅰ存在较大程度的遗传分化。值得注意的是，扬子鳄 *IGF*-Ⅰ有 3 个拷贝，其中 2 个拷贝与鸟纲近缘，另 1 个拷贝与中华鳖单独聚为一支，与缅甸蟒蛇和龟壳花蛇近缘，推测脊椎动物的 *IGF*-Ⅰ可能是由原始的爬行两栖动物起源而来。

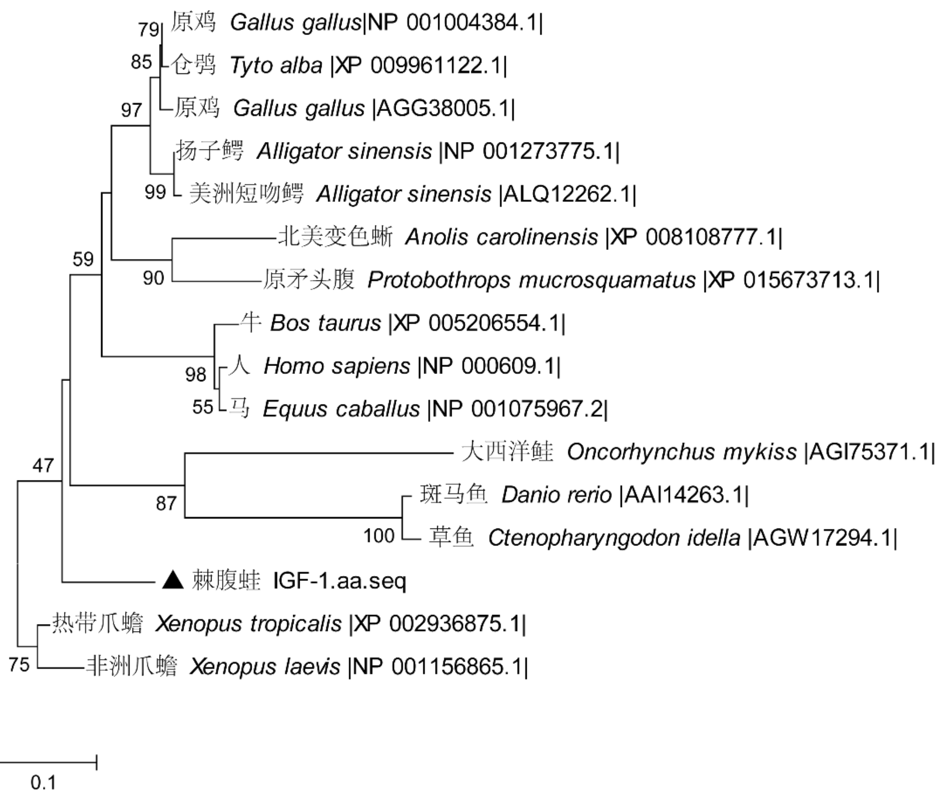
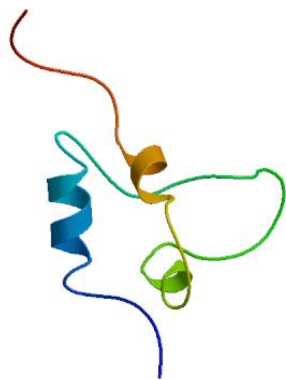
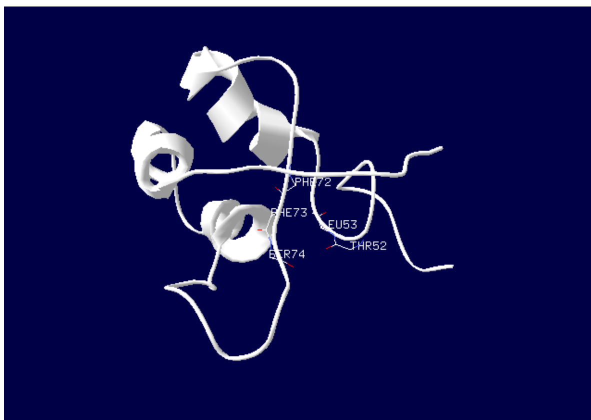



图 2　棘腹蛙 *IGF-*Ⅰ的聚类分析

Fig.2　The clustering analysis of *IGF-*Ⅰ form *Paa boulengeri*

为深入分析棘腹蛙 IGF-Ⅰ的蛋白质结构，我们利用 Swiss-model server 软件进行结构预测，如图 3 所示。相较于人类 IGFs 蛋白质结构 3lri.1A[10]而言，两者序列相似度达 84.6%。其氨基酸序列中，氨基酸 31～48 处存在 1 个跨膜域，氨基酸 51～109 处为 IGF-I-like superfamily 功能结构域。IGF-Ⅰ的蛋白质结构成分主要由 2 个 β 折叠和 4 个 α 螺旋构成，且两端存在未知功能区域，其中 THR52、LEU53、PHE72、PHE73、SER74 为物种特异的氨基酸突变位点，暗示该蛋白质存在一定功能分化。





A　　　　　　　　　　　　B

```
Model_01 MEKNNCPSTQLFKCYFCDILKVRMHTMTYMHLFYLGLCLLTLTHSAAAGQETLCGAELVDALQFVCGDRGFFFSK  75
3lri.1.A ---------------------------------------MPLSSLFVNGPRTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNK  40

Model_01 PVGYGYSSRRSHHKGIVDECCFQSCDLRRLEMYCAPAKPAKSARSVRAQRHTDMPKAQKEVHHKNASRGNTGSRS  150
3lri.1.APTGYGSSSRRACQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA-------------------------------  83

Model_01 FRM                                                                          153
3lri.1.A ---
```

C

A：棘腹蛙 IGF-I的蛋白质三维结构分析；B：棘腹蛙 IGF-I的特异功能结合位点预测；C：棘腹蛙 IGF-I 与人类 IGFs 模板 3lri.1.A[10]的蛋白质构象差异分析。

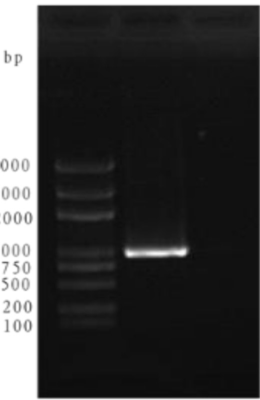
A: the 3D protein structure analysis of IGF-I from *Paa boulengeri*; B: the specific functional target prediction of IGF-I from *Paa boulenger*; C: the protein conformation difference analysis between IGF-I from *Paa boulengeri* and the IGFs template 3lri.1.A from human beings[10].

图 3　棘腹蛙 IGF-Ⅰ的蛋白质结构分析

Fig.3　The protein structure analysis of IGF-Ⅰ from *Paa boulengeri*

## 2.2 *IGF*-Ⅱ的序列特征分析

扩增棘腹蛙的 *IGF*-Ⅱ基因并测序，利用 ClustalX 1.83 软件对其遗传多态性进行分析，结果如图 4 所示。其氨基酸序列中，氨基酸 54～114 处为 *IGF*-II的功能结构域，氨基酸 147～204 处为 *IGF*-II_的 C 端功能结构域，暗示该基因可能主要参与棘腹蛙的免疫防御。与非洲爪蟾和热带爪蟾 2 种已知的两栖模式动物相比，棘腹蛙 *IGF*-Ⅱ的拷贝数明显减少，并且该基因的 N 端呈简缩进化趋势，且其功能结构域呈现插入突变，说明棘腹蛙 *IGF*-II的功能分化较为明显。




```
gcacatccagcaataccacagcgatcctttcactgccatcaccagtacagaggaaccgca
agaaaacttgacattcccagtcctgtcggagctgatcacaccagtgcaaa
atggagcaactaagatgcaaaaccaggagctgcagcagcacagcccagtcatgcaggagg
 M  E  Q  L  R  C  K  T  R  S  C  S  S  T  A  Q  S  C  R  R
atacagctgccaggagtgccagtcccccgacatgcccttctactcttatacaccttcata
 I  Q  L  P  G  V  P  V  P  R  H  A  L  L  L  L  Y  T  F  I
gcatacacagcagagtcatctaaagtatttatcctgggtgagaccctctgtggtggagaa
 A  Y  T  A  E  S  S  K  V  F  I  L  G  E  T  L  C  G  G  E
ctggtagacacgttgcaatttgtgtgtggcgaccgaggcttctacttcggtaagtcaacc
 L  V  D  T  L  Q  F  V  C  G  D  R  G  F  Y  F  G  K  S  T
tacaaaaagaatacggggcgctccaatcgcagagttagcagaggaattgtggaggaatgc
 Y  K  K  N  T  G  R  S  N  R  R  V  S  R  G  I  V  E  E  C
tgctttcggagttgtgacctagatttattagagacatactgtgcgaagccggtcaagaat
 C  F  R  S  C  D  L  D  L  L  E  T  Y  C  A  K  P  V  K  N
gaaagagacctttccaccgcaccagccactgcattgccatctctgaataaggatgagtac
 E  R  D  L  S  T  A  P  A  T  A  L  P  S  L  N  K  D  E  Y
cataagcatgctcataccaagcactctaaatatgacatctggcaaagaaagcccactcag
 H  K  H  A  H  T  K  H  S  K  Y  D  I  W  Q  R  K  P  T  Q
agtcaccgcttacgaagaggggtcccagccattgtccgagcacgccagtatcggaaatgg
 S  H  R  L  R  R  G  V  P  A  I  V  R  A  R  Q  Y  R  K  W
gtgaggcagatagaagaatcccagcagtttttatcacatcggccattaacaacctcacca
 V  R  Q  I  E  E  S  Q  Q  F  L  S  H  R  P  L  T  T  S  P
atgacacgacctcgctccaatcagcaagactcagagtcctcccataat
 M  T  R  P  R  S  N  Q  Q  D  S  E  S  S  H  N
tgagctgggaatcattactaagcaggattccactgccttcaatttctgtttctatgttct
gtttgtttttcttctgtcttctctgaactggagagagaccaagccaagcaacagagttga
agcctgaaaagctcaatgtgacacttcacagaagagtaaaacgagcaaactgagacacca
aag
```

A　　　　B

```
NP_001085129.    MEQLSCKHRSSSMEAEAQLCRQTESRSTQLPRMSVMRHLFLLSITFLVYTLDSAKAYRPT
AAH72153.1|      ------------MEAEAQLCRQTESRSTQLPRMSVMRHLFLLSITFLVYTLDSAKAYRPT
NP_001082128.    MEQLSCKHRSSSVEAEAQLCRQTESRSTQLPRMSVMRHLFLLSITFLVYTLDSAKAYRAT
AAH70545.1|      --------------------------------MSVMRHLFLLSITFLVYTLDSAKAYRAT
XP_012816009.    MEQLSCKHRSSSVDAEGQLCRQAESRSTQLPRMSVMRHLLLLSITFLVYTLDSAKAYGAT
XP_012816008.    MEQLSCKHRSSSVDAEGQLCRQAESRSTQLPRMSVMRHLLLLSITFLVYTLDSAKAYGAT
NP_001107144.    -----------------------------------MRHLLLLSITFLVYTLDSAKAYGAT
OCA36474.1       MEQLSCKH-------------QAESRSTQL----VMRHLLLLSITFLVYTLDSAKAYGAT
IGF-2-Pb.aa      MEQLRCKTR--SCSSTAQSCRR-----IQLPGVPVPRHALLLLYTFIAYTAESSKVFILG
                                                     **  :**  **:.**  :*:*.:

NP_001085129.    ETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFST------NNGRSNRRSNRGIVEECCFRSCDLELLETY
AAH72153.1|      ETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFST------NNGRSNRRSNRGIVEECCFRSCDLELLETY
NP_001082128.    ETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFST------NNGRSNRRPNRGIVDVCCFKSCDLELLETY
AAH70545.1|      ETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFST------NNGRSNRRPNRGIVDVCCFKSCDLELLETY
XP_012816009.    ETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSR------NNGRSNRRANRGIVEECCFRSCDLELLETY
XP_012816008.    ETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSR------NNGRSNRRANRGIVEECCFRSCDLELLETY
NP_001107144.    ETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSR------NNGRSNRRANRGIVEECCFRSCDLELLETY
OCA36474.1       ETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSR------NNGRSNRRANRGIVEECCFRSCDLELLETY
IGF-2-Pb.aa      ETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFGKSTYKKNTGRSNRRVSRGIVEECCFRSCDLDLLETY
                 ***********************.      *.*******.****:  ***:****:*****

NP_001085129.    CAKPSKNERDVSTAPATAIPPMNKQDLYHKHHHTKSSKYDIWQRK--SIHRLRRGVPAIV
AAH72153.1|      CAKPSKNERDVSTAPATAIPPMNKQDLYHKHHHTKSSKYDIWQRK--SIHRLRRGVPAIV
NP_001082128.    CAKPTKNERDVSTAPATAIPPLSKQDLYHKHHHTKSSKYDIWQRK--SIHRLRRGVPAIV
AAH70545.1|      CAKPTKNERDVSTAPATAIPPLSKQDLYHKHHHTKSSKYDIWQRK--SIHRLRRGVPAIV
XP_012816009.    CAKPAKNERDVSTAPSTAIPPLNK-DLYHKHHHTKSSKYDIWQRK--SIHRLRRGVPAIV
XP_012816008.    CAKPAKNERDVSTAPSTAIPPLNKQDLYHKHHHTKSSKYDIWQRK--SIHRLRRGVPAIV
NP_001107144.    CAKPAKNERDVSTAPSTAIPPLNKQDLYHKHHHTKSSKYDIWQRK--SIHRLRRGVPAIV
OCA36474.1       CAKPAKNERDVSTAPSTAIPPLNKQDLYHKHHHTKSSKYDIWQRK--SIHRLRRGVPAIV
IGF-2-Pb.aa      CAKPVKNERDLSTAPATALPSLNK-DVYHKHAHTKHSKYDIWQRKPTQSHRLRRGVPAIV
                 **** ******:*****:**:*.:.* *:***** ***  **********  . ************

NP_001085129.    RARQYRLLMQKAEESEQALLHRPLTTLPITRPLHLQQTSEPSHN
AAH72153.1|      RARQYRLLMQKAEESEQALLHRPLTTLPITRPLHLQQTSEPSHN
NP_001082128.    RARQYRLLMEKAEEAEQALSHRPLTTLPITRPLRLQQASEPSHN
AAH70545.1|      RARQYRLLMEKAEEAEQALSHRPLTTLPITRPLRLQQASEPSHN
XP_012816009.    RARQYRLLMQQAEESEQALSHRPLTTLPITRPLHLQQTSEPSLN
XP_012816008.    RARQYRLLMQQAEESEQALSHRPLTTLPITRPLHLQQTSEPSLN
NP_001107144.    RARQYRLLMQQAEESEQALSHRPLTTLPITRPLHLQQTSEPSLN
OCA36474.1       RARQYRLLMQQAEESEQALSHRPLTTLPITRPLHLQQTSEPSLN
IGF-2-Pb.aa      RARQYRKWVRQIEESQQFLSHRPLTTSPMTRPRSNQQDSESSHN
                 ******  :.:  **::* * ****** *:***   ** **.* *
```

C

A：棘腹蛙 *IGF-*Ⅱ的基因扩增；B：棘腹蛙 *IGF-*Ⅱ的序列分析；C：已知两栖动物的 *IGF-*Ⅱ遗传多态性分析。XP_012816009、XP_012816008、NP_001107144、OCA36474.1 注释为热带爪蟾 *IGF-*Ⅱ；NP_001085129、AAH72153.1、NP_001082128、AAH70545.1 注释为非洲爪蟾 *IGF-*Ⅱ。黄色表示棘腹蛙 *IGF-*Ⅱ潜在功能分化位点，红色下划线表示 N 端功能分化区域。

A: the gene amplification of *IGF-*Ⅱ from *Paa boulengeri*; B: the sequence analysis of *IGF-*Ⅱ from *Paa boulengeri*; C: the genetic polymorphism analysis of *IGF-*Ⅱ from known amphibians. NP_001085129, AAH72153.1, NP_001082128 and AAH70545.1 are stand for *IGF-*Ⅱ from *Xenopus laevis*; XP_012816009, XP_012816008, NP_001107144 and OCA36474.1 are stand for *IGF-*Ⅱ from *Xenopus tropicalis*. The potential differentiation amino acid sites of *IGF*-II from *Paa boulengeri* are shadowed in yellow, and the N terminal differentiation region is underline in red.

图 4　棘腹蛙 *IGF-*Ⅱ序列特征分析

Fig.4　The sequence characteristic analysis of *IGF-*Ⅱ form *Paa boulengeri*

棘腹蛙 *IGF-*Ⅱ同源序列的系统进化分析结果（图 5）显示，整个进化树分为三大支，一支为高等哺乳动物类，一支为两栖动物类，另一支则包括硬骨鱼、陆生动物及部分鸟类，说

明 *IGF*-Ⅱ基因的进化相对保守。

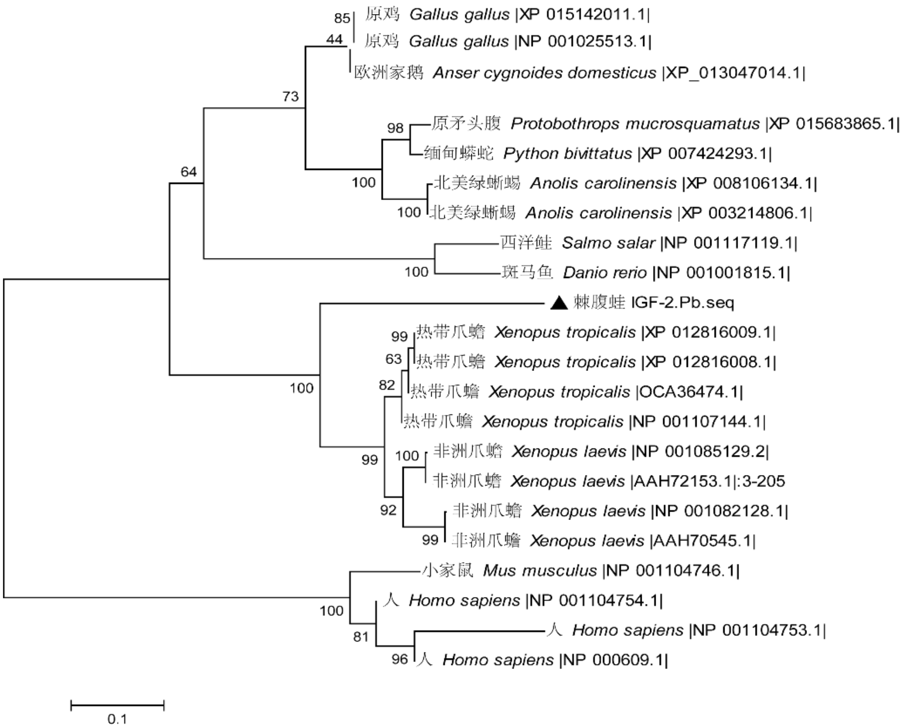
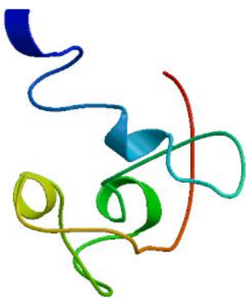
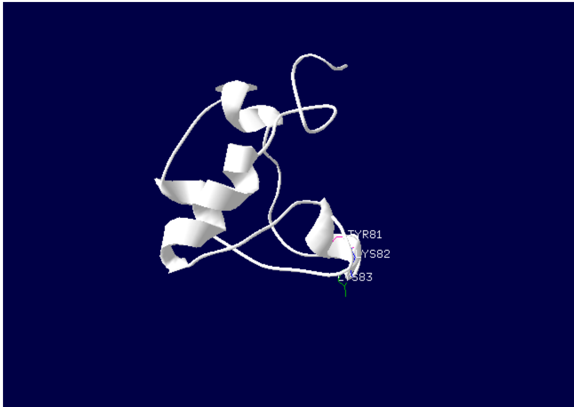



图 5 棘腹蛙 *IGF*-Ⅱ的聚类分析

Fig.5 The clustering analysis of *IGF*-Ⅱ from *Paa boulengeri*

利用 Swiss-model server 软件模拟 IGF-II蛋白质的三维结构，结果显示，其与棘腹蛙 IGF-I 蛋白质的结构类似，主要由 6 个 α 螺旋构成，其中 TYR81、LYS82、LYS83 存在特异的氨基酸位点突变，暗示该蛋白质在物种进化过程中存在一定的功能分化。

A B

```
Model_01 MEQLRCKTRSCSSTAQSCRRIQLPGVPVPRHALLLLYTFIAYTAESSKVFILG-ETLCGGELVDTLQFVCGDRGF 74
3lri.1.A --------------------------------------------SSLFVNGPRTLCGAELVDALQFVCGDRGF 36

Model_01 YFGKSTYKKNTGRSNRRVSR-GIVEECCFRSCDLDLLETYCA--KPVKNERDLSTAPATALPSLNKDVYHKHAHT 146
3lri.1.AYFNKPT---GYGSSSRRACQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKS------------------------ 82

Model_01 KHSKYDIWQRKPTQSHRLRRGVPAIVRARQYRKWVRQIEESQQFLSHRPLTTSPMTRPRSNQQDSESSHN 216
3lri.1.A ----------------------------------------------------------------------
```

C

A：棘腹蛙 IGF-Ⅱ的蛋白质三维结构分析；B：棘腹蛙 IGF-Ⅱ的特异功能结合位点预测；C：棘腹蛙 IGF-Ⅱ与人类 IGFs 模板 3lri.1.A[10]的蛋白质构象差异分析。

A: the 3D protein structure analysis of IGF-Ⅰ from *Paa boulengeri*; B: the specific functional target prediction of IGF-Ⅰ from *Paa boulenger*; C: the protein conformation difference analysis between IGF-Ⅰ from *Paa boulengeri* and the IGFs template 3lri.1.A from human beings[10].

图 6　棘腹蛙 IGF-Ⅱ的蛋白质结构分析

Fig.6　The protein structure analysis of IGF-Ⅱ from *Paa boulengeri*

对比 IGF-I和 IGF-II作用位点和结合方式差异的预测，我们利用 PDB-Viewer 还原了这 2 种蛋白质的蛋白质骨架，如图 3-A 和图 6-A 所示，黄色部分为 IGF-I和 IGF-II作用位点相同的区域，结果二者仅有 3 处区域有明显差异，其蛋白质修饰方式的对比显示所有差异位点均位于功能结合区域（图 3-B 和图 6-B），随后对二者功能差异位点的比对结果显示二者差异部分有 2 处为 IGFs 保守的功能结构域，其中一处为棘腹蛙 IGF-I特异的功能区域。由此可知，深入挖掘 IGFs 的功能对于研究棘腹蛙生理代谢的物种特异性具有重大意义。

### 2.3 *GH* 的序列特征分析

通过克隆测序（图 7-A），获得了棘腹蛙 *GH* 基因序列（图 7-B）。遗传多态性分析结果发现棘腹蛙 *GH* 与已知的两栖动物同源基因存在较少的氨基酸位点突变，并且其中大多数为同义氨基酸突变，对其功能结构影响不大（图 7-C）。

bp
5000
3000
2000
1000
750
500
200
100

```
                         tggaacccgaacatacatcaggaacgccgctaaactcaagca
atggcttcagggttgtgctcatctctcatactcttggtcataatgtgtcttcaaagcccg
 M  A  S  G  L  C  S  S  L  I  L  L  V  I  M  C  L  Q  S  P
ccagggttcaatgccttcccgcaaatgtctctttccaacctctttacaaacgctgtcatc
 P  G  F  N  A  F  P  Q  M  S  L  S  N  L  F  T  N  A  V  I
cgagctcagcaccttcaccagatggttgcagacacctacagagactatgaaaaaacatat
 R  A  Q  H  L  H  Q  M  V  A  D  T  Y  R  D  Y  E  K  T  Y
atacccgaagatcagagattttccaacaaacactcatactcagtgtattgctactcagaa
 I  P  E  D  Q  R  F  S  N  K  H  S  Y  S  V  Y  C  Y  S  E
accatcccggcaccaacagacaaggacaatactcaccagaaatcagatatggacctcctc
 T  I  P  A  P  T  D  K  D  N  T  H  Q  K  S  D  M  D  L  L
cgcttctcactcacgctcatgcagtcatggatgaccccagtccaaatcctcaacagagtc
 R  F  S  L  T  L  M  Q  S  W  M  T  P  V  Q  I  L  N  R  V
ttcggaaccaaccaggtgtttgggaatattgacagagtgtacgacagactgagggacctc
 F  G  T  N  Q  V  F  G  N  I  D  R  V  Y  D  R  L  R  D  L
gaggaaggagtacacattctcataagagagctggatgatggaaatgtccgtaactatggt
 E  E  G  V  H  I  L  I  R  E  L  D  D  G  N  V  R  N  Y  G
ctgctgacttttacatatgataagtttgatgtcaacctgcgcagcgaagaaggccgcgcg
 L  L  T  F  T  Y  D  K  F  D  V  N  L  R  S  E  E  G  R  A
aagaattacggtcttctgtcctgcttcaagaaagacatgcataaagtagagacctacctg
 K  N  Y  G  L  L  S  C  F  K  K  D  M  H  K  V  E  T  Y  L
aaggtcatgaagtgccggagatttgtggagagcaactgcaccttttaa
 K  V  M  K  C  R  R  F  V  E  S  N  C  T  F  *
ctaagaatcaggaaattgaaatatcctccatagtcccccccatctccctacctcttgcaga
cacccgctgcaatttgatatcttcaggaggtaggatctaataatattatatacattcct
gaccaatgcacatttttttgcagatgtcattttgctttgtgctttttgtgtctttgtacct
tct
```

A B

```
AAP04356.1        MASGLGSSLVLLVVICLQSPQGFNAFPRVSLSNLFTNAVIRAQHLHQMVADTYRDYERTY
CAA31038.1        MASGLGSSLVLLVVICLQSPQGFNAFPQMSLSNLFTNAVIRAQHLHQMVADTYRDYERTY
GH pre__Pb        MASGLCSSLILLVIMCLQSPPGFNAFPQMSLSNLFTNAVIRAQHLHQMVADTYRDYEKTY
XP_002933088.2    MATGFCSSFGLLVILLLKNVADAGAFPSVPLFSLFTNAVSRAQYLHMLAADTYRDYERTY
                  **:*: **: ***:: *:.  .  .*** :.* .****** ***:** :.********:**

AAP04356.1        IPEDQRLSNKHSYSVYCYSETIPAPTDKDNTHQKSDIDLLRFSLTLLQSWMTPIQIVNRV
CAA31038.1        IPEDQRFKQTLLISVYCYSETIPAPTDKDNTHQKSDIDLLRFSLTLLQSWMTPIQIVNRV
GH pre__Pb        IPEDQRFSNKHSYSVYCYSETIPAPTDKDNTHQKSDMDLLRFSLTLMQSWMTPVQILNRV
XP_002933088.2    ISEDQRHSNKNSHVVSCYSETIPYPTDKDNTHQKTDMELLRFSLNLIQSWLNPVQALSKV
                  *.****  .:.     * ******* **********:*::******.*:***:.*:*  :.:*

AAP04356.1        FGNNQVFGNIDRVYDRLRDLDEGLHILIRELDDGNVRNYGVLTFTYDKFDVNLRSEEGRA
CAA31038.1        FGNNQVFGNIDRVYDRLRDLDEGLHILIRELDDGNVRNYGVLTFTYDKFDVNLRSEEGRA
GH pre__Pb        FGTNQVFGNIDRVYDRLRDLEEGVHILIRELDDGNVRNYGLLTFTYDKFDVNLRSEEGRA
XP_002933088.2    FSNNLVFGSSD-VYERLKYLEEGIQALMRELEDGSFRNFPFLRPPYERFEINLRSDDALV
                  *..* ***.  * **:**: *:**:: *:***:**..**: .*   .*::*::****::. .

AAP04356.1        KNYGLLSCLKKDMHKVETYLKVVKCRRLVESNCTF
CAA31038.1        KNYGLLSCFKKDMHKVETYLKVMKCRRLVESNCTF
GH pre__Pb        KNYGLLSCFKKDMHKVETYLKVMKCRRFVESNCTF
XP_002933088.2    KVYGLLSCFKKDMHKVETYLKVMKCRRSVEGNCTI
                  * ******:*************:**** **.***:
```

C

图 7　棘腹蛙 *GH* 的序列特征分析

Fig.7　The sequence characteristic analysis of *GH* form *Paa boulengeri*

A：棘腹蛙 *GH* 的扩增；B：棘腹蛙 *GH* 的序列分析；C：已知两栖动物的 *GH* 遗传多态性分析。XP_002933088.2 注释为热带爪蟾 *GH*；AAP4356.1 和 CAA31038.1 注释为牛蛙 *GH*。黄色表示棘腹蛙 *GH* 潜在功能分化区域。

A: the gene amplification of *GH* from *Paa boulengeri;* B: the sequence analysis of *GH* from *P. boulengeri;* C: the genetic polymorphism analysis of *GH* from known amphibians. AAP4356.1 and CAA31038.1 are both stand for *GH* from *Rana catesbeiana*; XP_012816009 and XP_002933088.2 are both stand for *GH* from *Xenopus tropicalis*. The potential differentiation amino acid sites of *GH* from *Paa boulengeri* are shadowed in yellow.

图 7　棘腹蛙 *GH* 序列特征分析

Fig.7　The sequence characteristic analysis of *GH* form *Paa boulengeri*

与 *GH* 同源基因进行系统进化树聚类分析，结果如图 8 所示。棘腹蛙的 *GH* 与牛蛙近缘，并与草鱼、斑马鱼和淡水鳇等水生动物单独聚为一支，暗示水生动物 *GH* 具有共同的祖先，鸟类与陆生动物聚为一支，高等哺乳动物单独聚为一支，证实了棘腹蛙 *GH* 基因的进化相对保守。

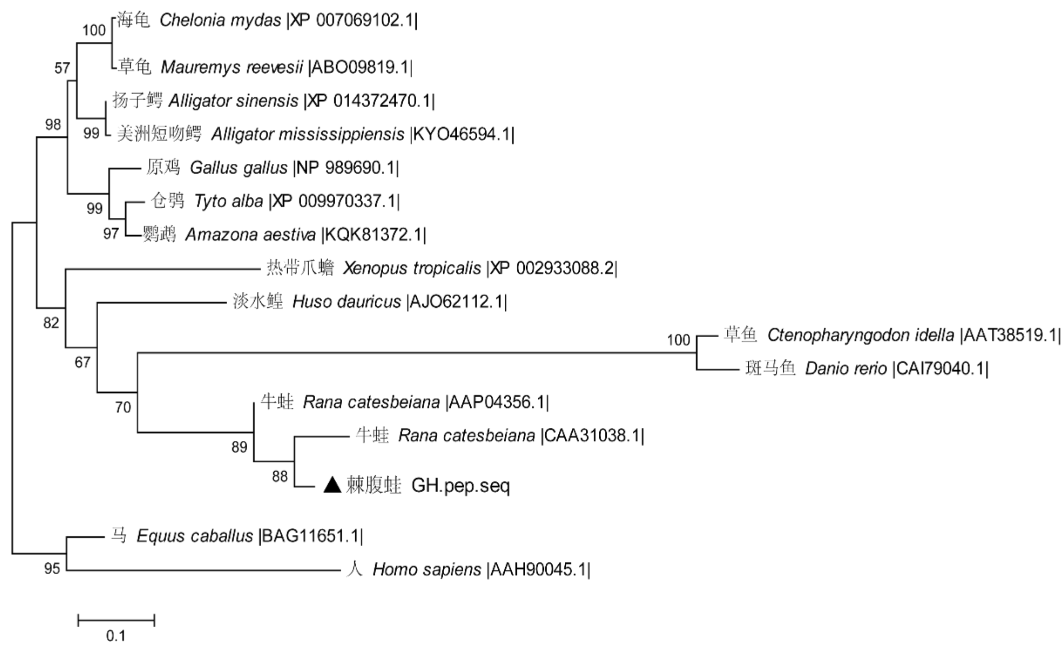



图 8　棘腹蛙 *GH* 的聚类分析

Fig.8　The clustering analysis of *GH* from *Paa boulengeri*

对棘腹蛙 GH 蛋白质结构进行分析，结果如图 9 所示。棘腹蛙 GH 具有典型的 Hormone_1 结构域（图 9-C），属于典型的 4-螺旋细胞因子（4-helix cytokines）（图 9-A）。其中，PHE208 与模式脊椎动物相比为突变位点（图 9- B 和图 9 - C ），而与两栖模式动物相比则相对保守，说明棘腹蛙 GH 功能结构域相对保守。

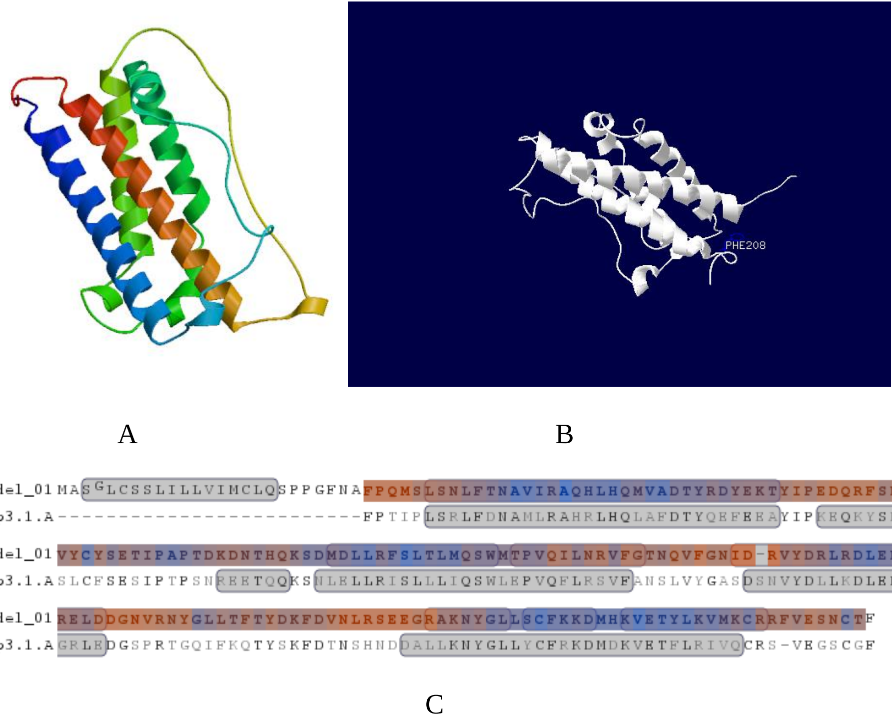



图 9　棘腹蛙 GH 的蛋白质结构分析

Fig.9 The protein structure of GH from *Paa boulengeri*

A：棘腹蛙 GH 的蛋白质三维结构分析；B：棘腹蛙 GH 的特异功能结合位点预测；C：棘腹蛙 GH 与人类 GH 模板 1bp3.1.A[11]的蛋白质构象差异分析。

A: the 3D protein structure analysis of GH from *Paa boulengeri*; B: the specific functional target prediction of IGF-Ⅰ from *Paa boulenger*; C: the protein conformation difference analysis between GH from *Paa boulengeri* and the GH template 1bp3.1.A from human beings[11].

图 9 棘腹蛙 GH 的蛋白质结构分析

Fig.9 The protein structure analysis of GH from *P. boulengeri*

## 3 讨 论

在 GH-IGFs 轴中，GH 处于上游位置，而 IGFs 则处于下游位置[12]。GH-IGFs 轴的作用并不单一，是由多种因子和多种调控模式组成了 GH 合成与分泌的调控网络[13]。GH/IGF-I 轴作为调控机体生长发育的主线[14]，其信号转递通路主要是通过启动 2 条信号传递链，即磷酯酰肌醇-3 激酶(PI3-K)激活途径和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)激酶激活途径，把有丝分裂和代谢信号传递到细胞核内，从而启动 IGFs 分泌，促进细胞增殖、分化以及抑制细胞的凋亡。IGF-I与其受体结合后，首先导致胰岛素底物-1(IRS-1)磷酸化，IRS-1 被磷酸化后，PI3-K 和生长因子结合蛋白 2(Grb2)才能够与其结合，由此启动 2 条信号传递链。一条途径是 PI3-K 被激活并形成磷酸化磷酸肌醇(PIP3)，PIP3 就是细胞生长的信号，且 PIP3 途径是抑制细胞凋亡的最经典途径。另一条途径是激活细胞外信号调节激酶(ERK)，ERK 把信号传递到细胞核内启动有丝分裂[15]。也就是说，IGF-I一方面通过增加细胞的有丝分裂来促进机体的生长，另一方面则通过抑制细胞的凋亡来促进机体的生长。

目前针对两栖动物 GH 功能的报道较少，在仅有的部分早期研究中发现，两栖动物变态前外源 GH 可刺激其幼体——蝌蚪的生长且在幼体的生长发育(尤其是肢的生长)中发挥特殊的作用[16]。外源性 GH 能促进蟾蜍幼体的生长，也能促进牛蛙幼体下肢的生长[17]。在蝌蚪发育的后期，血液中内源性 GH 水平会不断升高[16]。但内源性 GH 在两栖动物幼体生长、发育和变态中的确切作用仍然没有相应的报道。本研究针对棘腹蛙内源 *GH*、*IGF-*Ⅰ和 *IGF-*Ⅱ进行分析，结果发现三者与已知两栖模式生物相比均存在较多氨基酸突变位点，说明其存在一定程度的功能分化。遗传进化树聚类分析显示，与已知两栖模式动物相比，棘腹蛙 *IGF-*Ⅰ和 *IGF-*Ⅱ均存在特异的物种分化趋势，而 *GH* 的进化则相对保守。蛋白质结构分析显示，

与人类 IGFs 相比，棘腹蛙 IGF-I存在 5 处功能作用位点的分化区域，IGF-II存在 3 处功能作用位点的分化区域；而棘腹蛙 GH 与模式脊椎动物 GH 相比，则仅有 PHE208 处存在氨基酸突变，说明该氨基酸位点对于棘腹蛙的功能分化具有重要研究价值。值得注意的是，该位点在两栖动物中则相对保守，暗示 PHE208 是两栖动物与高等哺乳动物功能分化的氨基酸位点。

综上所述，尽管功能结构域和遗传进化特征相对保守，但棘腹蛙 IGF-I的 THR52、LEU53、PHE72、PHE73、SER74，IGF-II的 TYR81、LYS82、LYS83 以及 GH 的 PHE208 为潜在的功能作用位点和结合位点。鉴于本课题组前期研究发现 GH/IGFs 轴易受到温度影响，导致棘腹蛙蝌蚪无法变态甚至死亡，成蛙生长异常。因此，本研究为揭示温度如何介导 GH/IGFs 轴代谢机制进而调控棘腹蛙生长发育筛选了分子靶标，并为今后棘腹蛙优质品种选育提供理论依据。

## 4 结　论

棘腹蛙 GH/IGFs 轴的主要基因相对保守，但与已知模式物种相比，存在潜在的功能分化位点，可作为后期棘腹蛙 GH/IGFs 轴功能研究和遗传进化特征分析的分子靶标。

参考文献：

[1] POLLAK M.The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia:an update[J].Nature Reviews Cancer,2012,12(3):159–169.

[2] 费梁,叶昌媛,黄永昭,等.中国两栖动物检索及图解[M].成都:四川科学技术出版社,2005:137–139.

[3] YAN F,ZHOU W W,ZHAO H T,et al.Geological events play a larger role than Pleistocene climatic fluctuations in driving the genetic structure of *Quasipaa boulengeri* (Anura: Dicroglossidae)[J].Molecular Ecology,2013,22(4):1120–1133.

[4] 汪松,赵尔宓.中国濒危动物红皮书(两栖类和爬行类)[M].北京:科学出版社,1998:80–83.

[5] 汪松,解焱.中国物种红色名录:第 1 卷:红色目录[M].北京:高等教育出版社,2004:1–224.

[6] SHAN X,XIA Y,ZHENG YC,et al.The complete mitochondrial genome of *Quasipaa boulengeri* (Anura:Dicroglossidae)[J].Mitochondrial DNA, 2014,25(2):83–84.

[7] XIA Y,HU L J,SHAN X,et al.Isolation and characterization of eleven polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for *Quasipaa boulengeri* (Anura:Dicroglossidae)[J].Conservation Genetics Resources,2013,5(1):5–7.

[8] YUAN S Q,XIA Y,ZHENG Y C,et al.Development of microsatellite markers for the spiny-bellied frog *Quasipaa boulengeri* (Anura:Dicroglossidae) through transcriptome sequencing[J].Conservation Genetics Resources,2014,7(1):229–231.

[9] QING L Y,XIA Y,ZHENG Y C,et al.A *de novo* case of floating chromosomal polymorphisms by translocation in *Quasipaa boulengeri* (Anura,Dicroglossidae)[J].PLoS One,2012,7(10):e46163.

[10] LAAJOKI L G,FRANCIS G L,WALLACE J C,et al.Solution structure and backbone dynamics of long-[Arg(3)]insulin-like growth factor-Ⅰ[J].The Journal of Biological Chemistry,2000,275(14):10009–10015.

[11] SOMERS W,ULTSCH M,DE VOS A M,et al.The X-ray structure of a growth hormone-prolactin

receptor complex[J].Nature,1994,372(6505):478–481.

[12] PERRINI S,LAVIOLA L,CARREIRAM M C,et al.The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone:mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis[J].Journal of Endocrinology,2010,205(3):201–210.

[13] Canosa L F,Chang J P,Peter R E.Neuroendocrine control of growth hormone in fish[J].General and Comparative Endocrinology,2007,151(1):1–26.

[14] BARTKE A.Impact of reduced insulin-like growth factor-1/insulin signaling on aging in mammals:novel findings[J].Aging Cell,2008,7(3):285–290.

[15] JONES J I,CLEMMONS D R.Insulin-like growth factors and their binding proteins:biological actions[J].Endocrine Reviews,2002,16(1):3–34.

[16] MCLEAN E,DONALDSON E M.The role of growth hormone in the growth of poikilotherms[M]//SCHREIBMAN M.The endocrinology of growth,development,and metabolism in vertebrates.Amsterdam:Elsevier,1993:43–71.

[17] KIKUYAMA S,KAWAMURA K,TANAKA S,et al.Aspects of amphibian metamorphosis: hormonal control[J].International Review of Cytology,1993,145:105–148.

## Cloning and Sequence Characteristic Analysis of Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factors Axis Key Genes from *Paa boulengeri*

LUO Jie JIANG Yusong YANG Fan FAN Wenqiao* LI Xiaoying

(*Chongqing Research Centers of Conservation and Development on Rare & Endangered Aquatic Resources, College of Life Science & Forestry, Chongqing University of Art & Science, Chongqing* 402168, *China*)

Abstract: Growth hormone (GH)/insulin-like growth factors (IGFs) axis was composed of GH system and IGFs system, which can promote cell proliferation, regulate growth and development, regulate physiological metabolism, as well as played an important role in the regulation of growth and development. In order to clear the functional structure and evolution characteristics of GH/IGFs axis from *Paa boulengeri* and to provide the theoretical basis for regulation study of growth and development for *Paa boulengeri*, the *GH*, insulin-like growth factor-Ⅰ (*IGF*-Ⅰ) and insulin-like growth factor-Ⅱ (*IGF*-Ⅱ) from *Paa boulengeri* were cloned and the sequence characteristics of them were analysed. The results showed as follows: 1) multiple sequence alignment with amphibian model animals revealed that *GH*, *IGF*-Ⅰ and *IGF*-Ⅱ displayed respective genetic polymorphisms within conserved functional domains, and the N-terminal domain of *IGF*-Ⅱ showed a abbreviated evolution trend. 2) The phylogenic clustering analysis found that *IGFs* from *Paa boulengeri* and amphibians were classified to one cluster, and they had a near relationship with bony fish, which indicated *IGF*-Ⅰ and *IGF*-Ⅱ were comparatively ancient genes. *IGFs* from *Paa boulengeri* had a near relationship with aquatic animals such as frogs and fishes, which implied *GH* had a trend of convergent evolution. 3) To further define the specific functional sites of above genes, the protein structure of them were analysed by SWISS software, and some potential functional differentiation sites were found including THR52, LEU53, PHE72, PHE73 and SER74 from IGF-Ⅰ, TYR81, LYS82 and LYS83 from IGF-Ⅱ, and PHE208 from GH. The results indicate that the major genes of GH/IGFs axis from *Paa boulengeri* are

---

*Corresponding author, associate professor, E-mail: wonderbreeze@126.com (责任编辑 菅景颖)

relatively conserved, but their exist some potential functional differentiation sites compared with known model species, which can be as molecular targets for the functional study and genetic characteristics analysis of GH/IGFs axis from *Paa boulengeri* in future.

Key words: *Paa boulengeri*; IGFs; GH; sequence analysis; structure characteristics